

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 440**

21 Número de solicitud: 201400165

51 Int. Cl.:

G01N 21/33 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.02.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.06.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (100.0%)
Pabellón de Gobierno, Avda. de los Castros s/n
39005 Santander (Cantabria) ES

72 Inventor/es:

VALIÑO LLAMAZARES, Virginia;
VALIENTE BARROSO, Rafael;
SAN ROMÁN SAN EMETERIO, María Fresnedo;
IBÁÑEZ MENDIZÁBAL, Raquel y
ORTIZ URIBE, Inmaculada

54 Título: **Método de espectroscópico para la determinación de proteínas en medios complejos**

57 Resumen:

Método espectroscópico para la determinación de proteínas en medios complejos.

La presente invención se refiere a un método de determinación cuantitativa de dos proteínas con características similares en una muestra, basado en medidas espectroscópicas de fluorescencia y absorción en UV. Este método permite obtener la concentración de las proteínas de una forma sencilla y rápida evitando la destrucción de la muestra, y es útil en los sectores biotecnológico o alimentario.

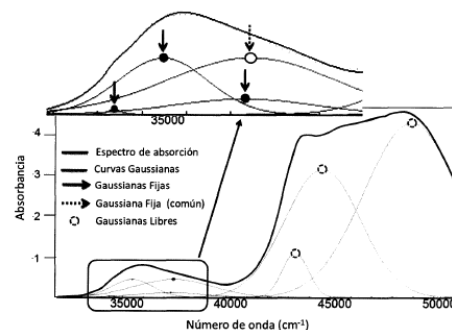


FIG. 2

DESCRIPCIÓN**Método espectroscópico para la determinación de proteínas en medios complejos**

La presente invención se refiere a un método de determinación cuantitativa de una mezcla de dos proteínas en una muestra, basado en medidas espectroscópicas de fluorescencia y absorción en la región ultravioleta-visible (UV-Vis). Este método es aplicable principalmente en el sector en el sector alimentario y en procesos biotecnológicos donde la separación y valorización de proteínas precisa su determinación cuantitativa.

ESTADO DE LA TÉCNICA

En la naturaleza existen moléculas con un alto interés comercial debido a sus propiedades farmacéuticas y nutracéuticas como son las proteínas del suero lácteo. Éstas se encuentran siempre en medios complejos y en muchos casos presentan características similares, por lo que su separación y posterior cuantificación resulta complicada.

Las técnicas para la cuantificación de proteínas pueden dividirse en dos tipos:

- Técnicas para la determinación de la concentración total de proteínas, tales como los métodos Kjeldahl, Sorensen-Walker, la reacción Folin-Ciocalteu, espectrofotometría UV-Vis, refractometría, técnicas turbidimétricas y nefelométricas, método Bradford, Lowry o de fijación de colorante (BCA).
- Técnicas para la detección individual de proteínas: electroforesis, cromatografía y técnicas de inmunoensayo (ELISA).

Aunque existen propuestas en la bibliografía para la determinación de proteínas del suero lácteo tanto de manera total como individual, hasta la fecha ninguna de ellas permite obtener resultados fiables cuando se trata de proteínas con contenidos en aminoácidos similares, así como tamaños y

propiedades poco diferenciables que implican la imposibilidad de su medida mediante la lectura simple de los espectros de absorción o en su aislamiento por tamaño.

5

Los métodos para la determinación de la concentración total de proteínas se basan en aproximaciones del contenido proteico total al de una proteína modelo, la albúmina de suero bovino (BSA), dando valores de concentración que difieren en muchos casos de la realidad, ya que las proteínas diferenciadas presentan valores distintos de absorbancia para una misma concentración, posiblemente debido a efectos de agregación.

20

Algunos métodos para la determinación de proteínas en leche han sido descrito en los siguientes documentos: Rukke, E. O., et al. *Journal of Dairy Science* 93.7 (2010): 2922-2925: *Comparing calibration methods for determination of protein in goat milk by ultraviolet spectroscopy*, donde se determina la concentración proteica total basada en la cuarta derivada de los espectros de absorción; sin embargo, estas medidas se hacen en base a una proteína modelo, difiriendo los valores de absorción con respecto a las proteínas reales en algunos casos con incertidumbres superiores al 30%. En el artículo publicado por Bogomolov A., and Melenteva A. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 126 (2013): 129–139 titulado *Scatter-based quantitative spectroscopic analysis of milk fat and total protein in the region 400–1100 nm in the presence of fat globule size variability*, se realiza un análisis espectroscópico cuantitativo basado en la dispersión de grasa y proteína total en la región de 400-1100 nm en presencia de glóbulos de grasa de tamaño variable. De igual modo aproxima el valor de proteína total a estándares cuya concentración puede diferir de la real y, por tanto, de la absorbancia real.

55

Los métodos de determinación de la concentración total de proteínas (Kjeldahl y absorción, fundamentalmente) sólo pueden determinar

aproximaciones en la concentración de proteínas cuando se encuentran en mezclas que toman como referencia una proteína modelo.

5 Por otra parte, los métodos para la determinación individual de proteínas son
costosos, lentos, destructivos y no aplicables a medios complejos ya que son
10 muy sensibles a las interferencias. Un ejemplo de estas interferencias puede
ser la presencia de sales que forman iones simples mucho más afines a las
columnas basadas en intercambio iónico u otras proteínas de características
15 similares que pueden tener bandas de absorción en el mismo rango
espectral.

20 Tal y como se acaba de describir se puede concluir que, los métodos
disponibles para la medida de proteínas lácteas presentan grandes
25 inconvenientes. Con respecto a las técnicas de determinación individual
como son las de inmunoensayo, a pesar de ser muy sensibles, tienen un
elevado coste, ya que para su medida es necesario el uso de un kit que no
30 puede ser usado más de una vez. Por otro lado, los ligandos específicos
tienen muchas limitaciones en cuanto al medio en que están presentes,
35 siendo la presencia de tensioactivos, así como de otras proteínas similares
una interferencia importante; por otra parte, el color producido por la unión
se desvanece con el tiempo.

40 Las técnicas electroforéticas, a pesar de que se ha producido una mejora de
45 las mismas respecto a su velocidad, automatización y reproducibilidad, al
estar basadas en el tamaño y movilidad electroforética de las proteínas no
permiten distinguir proteínas similares, siguen teniendo limitaciones en la
50 sensibilidad y reproducibilidad, especialmente debido a la interferencia de
otras sustancias que puedan estar presentes en el medio.

55 Las técnicas cromatográficas (cromatografía líquida) son caras debido al uso
de columnas con baja vida útil y presentan el gran inconveniente de la alta
generación de residuos. De igual modo, el medio juega un papel importante

en estas medidas no siendo posible la medida en medios con alto contenido salino.

En el caso de los métodos de fluorescencia aplicados hasta el momento, éstos se basaban en ligar la proteína a una sustancia fluorescente pero este proceso es laborioso, destructivo y caro, y en general no tiene en cuenta efectos de agregación.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención resuelve los inconvenientes que presentan los métodos de cuantificación de proteínas disponibles hasta el momento y presenta un método de medida de dos proteínas de características similares en un medio electrolítico mediante la combinación de las medidas de los espectros de fluorescencia fotoestimulada y de absorción en el rango ultravioleta. Se trata de una medida no destructiva, rápida, fiable, y en la que se reducen los costes de operación significativamente. Además, es un método en el que no se generan residuos.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la determinación cuantitativa de una mezcla de dos proteínas en una muestra biológica aislada que comprende:

- i. Realizar la calibración de la intensidad y posición de las bandas de fluorescencia y absorción ultravioleta con muestras patrones de concentración de cada una de las proteínas a determinar y de sus muestras en medio electrolítico y con el pH fijado entre 3-9 mediante el empleo de cubetas de cuarzo;
- ii. Medir el espectro de excitación de fluorescencia en la longitud máxima de emisión de la proteína para obtener curvas de intensidad en fluorescencia vs. longitud de onda;

- iii. Determinar la posición del centro de la banda de fluorescencia vs. al número de onda para las proteínas individuales y sus mezclas y realizar el calibrado de la posición en función del porcentaje de una de ellas;

5
- iv. Medir el espectro de absorción en el rango azul-ultravioleta de las proteínas individuales y sus mezclas para obtener los espectros de absorción en ultravioleta vs. al número de onda;

10
- v. Determinar la concentración de las proteínas en la muestra mediante el ajuste del perfil a la contribución de gaussianas libres y fijas que describan los perfiles de absorción ultravioleta-visible, coincidiendo en posición y anchura una de las gaussianas fijas para ambas proteínas. El número de gaussianas necesarias para cada proteína se determinará en el proceso de ajuste de los espectros permaneciendo el número constante a lo largo de las mediciones;

15

20

25

30
- vi. Determinar las curvas de intensidad de absorción dada por la altura de la gaussiana común frente a la concentración en función del porcentaje de proteína y realizar una curva de calibrado pendiente de la recta frente al porcentaje de proteína;

35

40
- vii. Medir los espectros de excitación y absorción ultravioleta de la muestra problema;

45
- viii. Determinar la posición de la banda de excitación y con la recta de calibración el porcentaje de una de las proteínas;

50
- ix. Determinar la altura de la gaussiana común en los ajustes de la curva de absorción ultravioleta y con el valor de la pendiente de la curva de calibración determinar la concentración total.

55

Una vez obtenidos estos datos se procede al cálculo de la concentración de la muestra teniendo en cuenta que será proporcional a la altura de la gaussiana común.

5

En el caso de que el método no se cumpla, diluir la mezcla dado que puede estar superando el rango de concentración máxima (1mg/mL).

10

En primer lugar, se realiza el calibrado tanto de la intensidad de la fluorescencia como de la absorción ultravioleta de muestras patrones de concentración de la proteína individual conocida y de mezclas de composición y concentración fijadas. Se ajusta el pH a un valor fijo entre 3 y 9 (v. Ejemplo) para evitar variaciones en los espectros de la muestra mediante la adición de ácido o base como por ejemplo NaOH o HCl.

15

20

25

Para la realización del calibrado es necesario medir los patrones tanto de la intensidad de fluorescencia como de la absorción ultravioleta-visible. Primeramente, se mide la absorción obteniéndose los espectros de absorción vs. al número de onda. Posteriormente, se determina el máximo de emisión de la proteína. Por último, se mide el espectro de excitación de la fluorescencia en la longitud del máximo de emisión de las proteínas y se obtienen las curvas de intensidad de la fluorescencia vs. al número de onda.

30

35

40

Del espectro de fluorescencia se obtiene el calibrado de la posición de la banda de excitación de la fluorescencia vs. al número de onda frente al porcentaje en peso de una de las proteínas de la mezcla binaria. Con este calibrado se puede determinar la proporción de cada proteína en la muestra.

45

50

De la medida de absorción se puede determinar la concentración total de proteínas en la muestra. Para ello es necesario representar la curva de absorbancia vs. al número de onda y ajustar el perfil a la contribución de gaussianas libres y fijas que describan el perfil del espectro, coincidiendo en

55

posición y ancho una de las gaussianas fijas para ambas proteínas. En la presente invención se entiende como “gaussianas libres” aquellas curvas a las que no se les ha fijado ni la posición, ni la anchura ni la altura. En la presente invención se entiende como “gaussianas fijas” aquellas curvas a las que se les ha restringido tanto su posición como anchura, dejando solo libre el valor de la altura, que es proporcional a la intensidad de luz absorbida y, por lo tanto, a la concentración.

Para el calibrado de la concentración total se toma como referencia la altura de la gaussiana común (intensidad) para las distintas concentraciones totales tanto de proteína individual como de mezclas de porcentaje conocido. Con los ajustes de estas rectas se obtiene la pendiente de las curvas y este valor es proporcional al porcentaje de cada proteína, se realiza por tanto una curva patrón de pendiente de absorción ultravioleta frente al porcentaje de concentración de una de las proteínas.

Dado que a partir del calibrado en fluorescencia se conoce el porcentaje de cada proteína, se calcula la pendiente de la curva de absorción que se debe tener en cuenta y con este valor se calcula la concentración total mediante la siguiente ecuación:

$$\text{concentración total} = \text{altura de la gaussiana común} / \text{pendiente correspondiente al \% de proteína de la muestra}$$

Normalmente, en los calibrados realizados en el método de la invención se obtienen regresiones superiores a 0,98 y las incertidumbres o errores estadísticos son inferiores al 14%, siendo los promedios menores al 5%.

En el caso de que el método no funcionara, proceder a la dilución de la muestra en el mismo medio electrolítico o en KCl si este no es conocido. Se puede haber rebasado el límite de concentración para el que el método es adecuado (1mg/mL)

El método de la invención es aplicable para determinar cualquier tipo de proteínas con características similares, aunque es especialmente adecuado para determinar la concentración de proteínas lácteas tales como la lactoferrina, albúmina de suero bovino, lactoalbúmina, lactoglobulina, etc.

5

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25

Figura 1. Muestra la curva intensidad de fluorescencia frente al número de onda (espectro de emisión o fluorescencia) y la determinación de su posición o centro. Se ha empleado una cubeta de cuarzo de 1 cm.

30

Figura 2. Muestra el ajuste del espectro de absorción ultravioleta (absorbancia o similar frente al número de onda) mediante 3 gaussianas libres y 4 fijas conocidas del calibrado. Se ha empleado una cubeta de cuarzo de 1 cm.

40

Figura 3. Muestra la curva de calibrado de la posición de la banda de fluorescencia frente al porcentaje de proteína BSA.

45

Figura 4. Rectas de calibración altura de la gaussiana vs proteína total para los distintos porcentajes relativos de proteína.

50

Figura 5. Muestra la curva de calibrado: pendientes de la rectas de concentración total vs altura gaussiana (Figura 4) frente al porcentaje de proteína BSA.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del procedimiento de la invención.

Ejemplo 1

A continuación se cita un ejemplo de la aplicación del método a una medida de una muestra de concentración conocida de albúmina de suero bobino (BSA) y lactoferrina (LF) en un medio electrolítico.

a) Se realiza una dilución para garantizar que la muestra no tenga una concentración total superior a 1g/L y se ajusta el pH a 3.0.

b) Utilizando una cubeta de cuarzo se mide el espectro de fluorescencia de la muestra problema en función de la longitud de onda 280-500nm con excitación a 277nm y se determina la posición de la banda de emisión o fluorescencia (Figura 1). En la presente muestra la posición del máximo de emisión resulta ser 324,76 nm.

c) Se introduce la muestra en el espectrofotómetro de absorción óptica y se obtiene el espectro de absorción en la región azul-ultravioleta del espectro.

d) Mediante un programa informático se ajusta el espectro de absorción como la contribución, en este caso, de tres gaussianas de posición, anchura y altura variables y cuatro gaussianas de posición y anchura

conocidas y fijas (las utilizadas para la descripción de las proteínas individuales en el calibrado).

- 5 e) Se ajustan las gaussianas (Figura 2) y se toma el valor de la altura de la gaussiana común a las dos proteínas. En la presente muestra 0,45.
- 10 f) Se introduce el valor de la posición de la curva de fluorescencia en la recta de calibrado "posición frente a porcentaje de BSA" y se obtiene la contribución relativa de cada proteína (Figura 3). En la presente
15 muestra la posición de la curva que se encuentra en 324,76 nm (0.0031 cm^{-1}) corresponde a un porcentaje de 90,16% de BSA y
20 9,84% de LF.
- 25 g) Con este valor se escoge la pendiente adecuada de las rectas altura de la gaussiana frente a concentración total de proteína (Figuras 4 y 5) y se determina la concentración de la muestra con la altura de la
30 gaussiana medida. Para la presente muestra, un 90,16% de BSA da una pendiente de 0,44 y con la altura de la gaussiana común de 0,45 se obtiene la concentración total de la muestra 1,02 g/L.
- 35 h) Por lo tanto, se obtiene que la muestra está formada por 0,92 g/L de BSA y 0,10 g/L de LF.
40

REIVINDICACIONES

I. Método para la determinación cuantitativa de una mezcla de dos proteínas en una muestra biológica aislada que comprende:

- 5 i. realizar un calibrado de la intensidad y posición de las bandas de fluorescencia y de absorción ultravioleta con muestras patrones de concentración de cada una de las proteínas a determinar y de sus muestras en medio electrolítico a pH fijo entre 3 y 9;
- 10 ii. medir el espectro de excitación de fluorescencia en la longitud máxima de emisión de la proteína para obtener curvas de intensidad en fluorescencia vs. al número de onda;
- 15 iii. determinar la posición del centro de la banda de fluorescencia vs. el número de onda para las proteínas individuales y sus mezclas y realizar en calibrado de la posición en función del porcentaje de una de ellas;
- 20 iv. medir el espectro de absorción en la región azul-ultravioleta de las proteínas individuales y sus mezclas para obtener los espectros de absorción en ultravioleta vs. el número de onda;
- 25 v. determinar la concentración de las proteínas en la muestra mediante el ajuste del perfil a la contribución de gaussianas libres y fijas que lo describen los perfiles de ultravioleta-visible, coincidiendo en posición y ancho una de las gaussianas fijas para ambas proteínas;
- 30 vi. determinar las curvas de intensidad de absorción dada por la altura de la gaussiana común frente a la concentración en función del porcentaje de proteína y realizar una curva de calibrado pendiente de la recta frente al porcentaje de proteína;
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

- vii. medir los espectros de excitación y absorción ultravioleta de la muestra problema;
 - viii. determinar la posición de la banda de excitación y con la recta de calibración el porcentaje de una de las proteínas.
5
 - ix. determinar la altura de la gaussiana común en los ajustes de la curva de absorción ultravioleta y con el valor de la pendiente de la curva de calibración determinar la concentración total.
10
- 15 2. Método según la reivindicación 1, donde las proteínas a determinar son de origen lácteo.
- 20
- 25 3. Método según la reivindicación 2, donde las proteínas se seleccionan de entre albúmina de suero, lactoferrina, albúmina de suero bovino, lactoalbúmina, lactoglobulina.

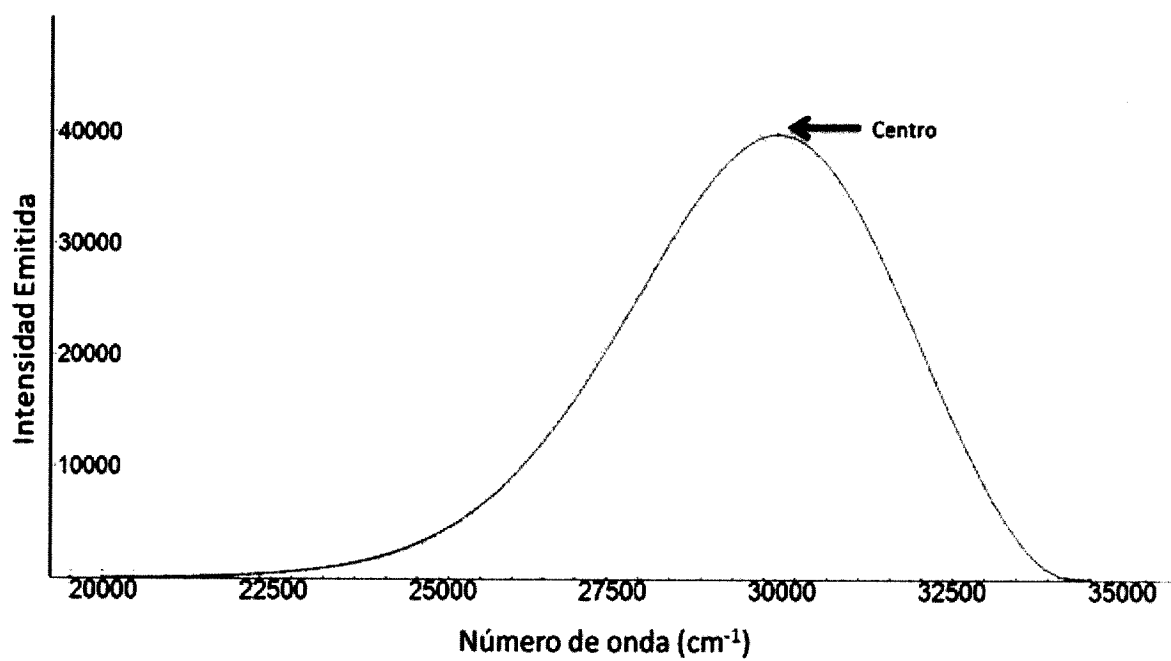


FIG. 1

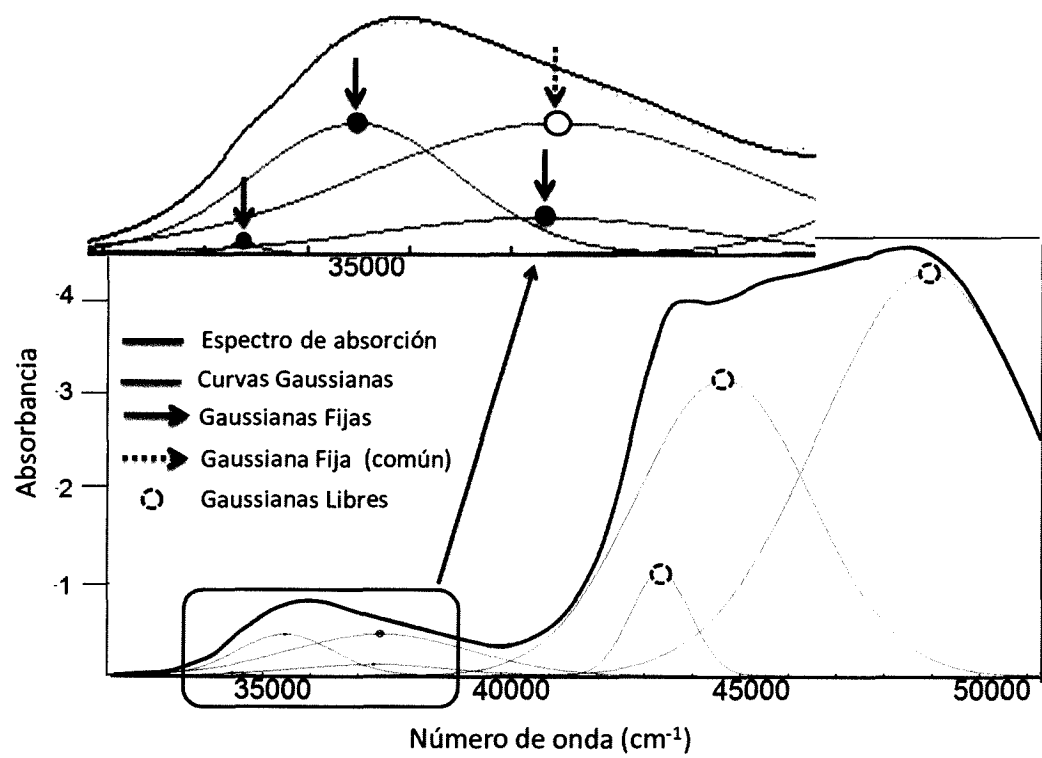


FIG. 2

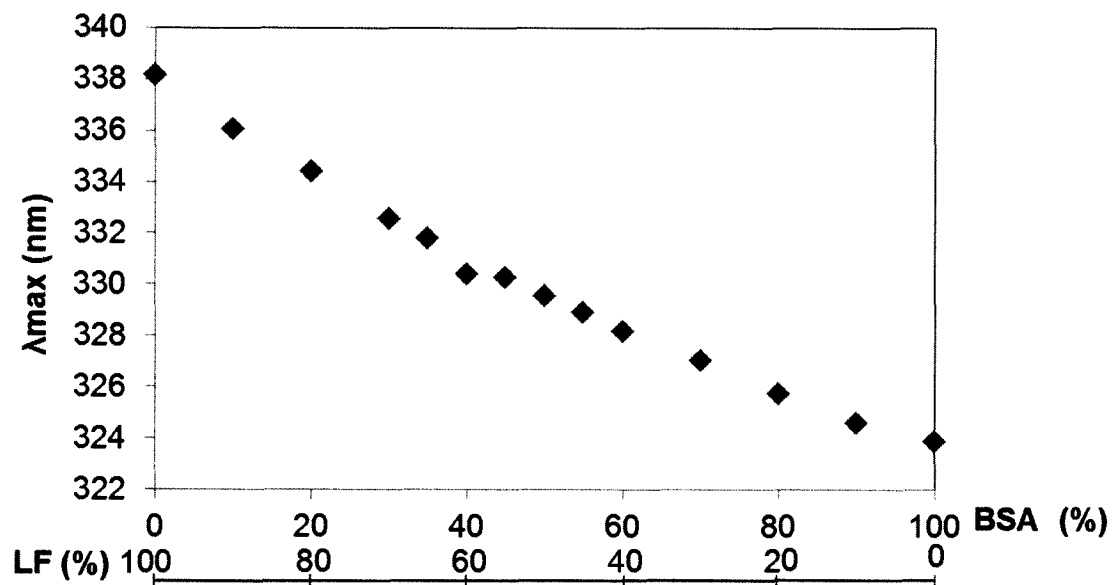


FIG. 3

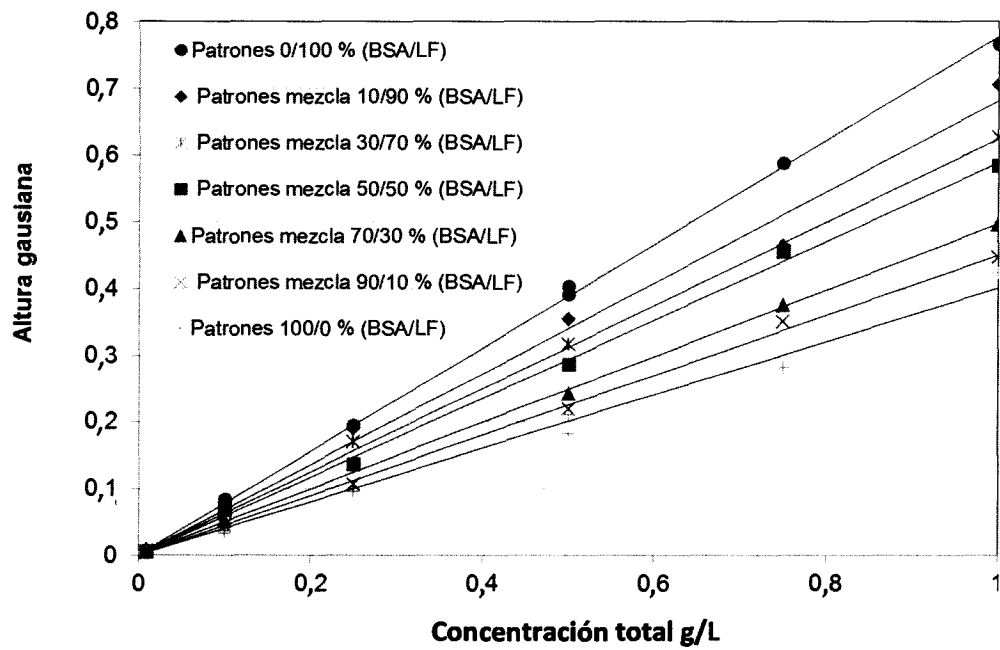


FIG. 4

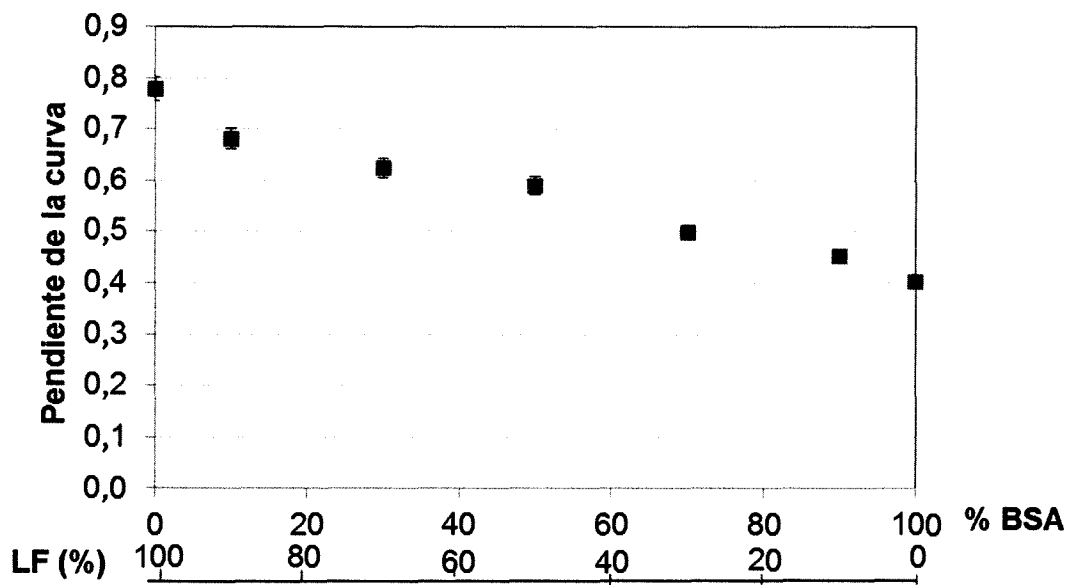


FIG. 5



- ②① N.º solicitud: 201400165
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.02.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KULMYRZAEV, A. et al. "Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy". LAIT. Noviembre-Diciembre 2002. Vol. 82, N.º. 6, páginas 725-735; todo el documento.	1-3
A	RUKKE, E.O. et al. "Comparing calibration methods for determination of protein in goat milk by ultraviolet spectroscopy". JOURNAL OF DAIRY SCIENCES. 01.07.2010. Vol. 93, N.º. 7, páginas 2922-2925; todo el documento.	1-3
A	BALESTRIERI, C. et al. "Second-derivative spectroscopy of proteins. A method for the quantitative determination of aromatic amino acids in proteins". EUR. J. BIOCHEM. 01.10.1978. Vol. 90, N.º. 3, páginas 433-440; todo el documento.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.05.2014

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N21/33 (2006.01)**G01N21/64** (2006.01)**G01N33/68** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.05.2014

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-3
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-3
Reivindicaciones

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención es un método para cuantificar dos proteínas en una mezcla en el que se utilizan los espectros de absorción ultravioleta y de fluorescencia de la mezcla. Se calculan las gaussianas del espectro de absorción y se calcula la altura de la gaussiana común a las dos proteínas. Este dato se utiliza en las curvas de calibrado para determinar la concentración de cada una de las proteínas en la mezcla. El método se utiliza para cuantificar proteínas lácteas similares.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KULMYRZAEV, A. et al. "Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy". LAIT. Noviembre-Diciembre 2002. Vol. 82, N°. 6, páginas 725-735; todo el documento.	
D02	RUKKE, E.O. et al. "Comparing calibration methods for determination of protein in goat milk by ultraviolet spectroscopy". JOURNAL OF DAIRY SCIENCES. 01.07.2010. Vol. 93, N°. 7, páginas 2922-2925; todo el documento.	
D03	BALESTRIERI, C. et al. "Second-derivative spectroscopy of proteins. A method for the quantitative determination of aromatic amino acids in proteins". EUR. J. BIOCHEM. 01.10.1978. Vol. 90, N°. 3, páginas 433-440; todo el documento.	

El documento D01, describe un método que utiliza espectroscopía de fluorescencia para determinar en leche productos de la reacción de Maillard.

El documento D02, describe un método en el que se utiliza espectroscopía ultravioleta para la determinación de proteínas totales en leche de cabra.

El documento D03, describe un método para determinar los aminoácidos aromáticos en proteínas, utilizando el espectro de absorción ultravioleta.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA****Reivindicaciones 1-3**

No se ha encontrado en el estado de la técnica, ningún documento en el que se describa un método de cuantificación de proteínas en el que se combinan técnicas de espectroscopía de absorción y ultravioleta. Por tanto, se considera que los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica y no suponen una particular relevancia, ya que para una persona experta en la materia, no sería obvio aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención tal y como se menciona en las reivindicaciones 1-3. Por lo tanto, el objeto de la presente solicitud cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.